



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11080025 A**(43) Date of publication of application: **23 . 03 . 99**

(51) Int. Cl

A61K 39/395
A61K 39/395
A61K 45/00
C12N 15/09
// C12P 21/08
(C12P 21/08 , C12R 1:91)

(21) Application number: **10130715**(22) Date of filing: **13 . 05 . 98**

(30) Priority: **15 . 05 . 97 JP 09125505**
18 . 07 . 97 JP 09194445

(71) Applicant: **CHUGAI PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **SATO ISAO**
TSUNENARI TOSHIAKI
ISHII KIMIE

(54) **CACHEXIA THERAPEUTIC AGENT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject therapeutic agent which controls the decrease of body weight and has a prolongation effect survival term by formulating a substance which inhibits the linkage between a parathyroid hormone-related peptide(PTHrP) and its receptor.

SOLUTION: The objective therapeutic agent is obtained by formulating an antagonist against PTHrP receptor, an

anti-PTHrP antibody [e.g. humanized #23-57-137-1 antibody, which connects the complementation determination domain of humanized or chimera antibody, particularly #23-57-137-1 antibody arising from mouse, to three FR fragments (FR1, FR2 and FR3) arising from human antibody HSU03868 and an FR fragment (FR4) arising from human antibody S25755 on the L-chain and to the framework domain of humanized antibody 31679 on the H-chain], an anti-PTHrP antibody fragment and/or its modified product.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-80025

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl.⁶
A 6 1 K 39/395

識別記号
A G Z

F I
A 6 1 K 39/395

A G Z N
D

45/00

C 1 2 N 15/09

Z N A

// C 1 2 P 21/08

45/00

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-130715

(22) 出願日 平成10年(1998) 5月13日

(31) 優先権主張番号 特願平9-125505

(32) 優先日 平 9 (1997) 5月15日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平9-194445

(32) 優先日 平 9 (1997) 7月18日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 佐藤 功

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

(72) 発明者 恒成 利明

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

(72) 発明者 石井 公恵

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 悪液質治療剤

(57) 【要約】

【課題】 悪液質治療剤の提供。

【解決手段】 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤。

【請求項2】 物質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニストである請求項1記載の悪液質治療剤。

【請求項3】 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体である請求項1記載の悪液質治療剤。

【請求項4】 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び、又はその修飾物である請求項1記載の悪液質治療剤。

【請求項5】 抗体がヒト型化又はキメラ化されたものである請求項3又は4記載の悪液質治療剤。

【請求項6】 ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1抗体である請求項5記載の悪液質治療剤。

【請求項7】 抗体がモノクローナル抗体である請求項3又は4記載の悪液質治療剤。

【請求項8】 悪液質が癌由来のものである請求項1～7のいずれか1項に記載の悪液質治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein (PTHrP)) とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪液質治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】末期癌患者にみられる悪液質は、悪性腫瘍の随伴性症候群の一つであり、食欲不振、体重減少、貧血、水電解質の異常、免疫異常などを主症状とする全身状態の不良をきたす。癌患者にとって、悪液質の発症は、生命を脅かす終末期症状をもたらすのみならず、患者のQOL (Quality of life) を著しく損ない、患者自身はもちろん、家族や周囲の人に強い精神的、身体的、社会的影響を及ぼす。

【0003】近年、癌悪液質の原因物質であると考えられていたカケクチンが、腫瘍壊死因子 (TNF) と同一因子であることが明らかになった。その後、インターロイキン1 (IL-1) やIL-6、LIF、IFNなどのサイトカインにも同様の作用が明らかになり、癌悪液質は、複数の因子による複合的に作用する病態であることが明らかになってきた。

【0004】ヒト口腔底癌由来OCC-1細胞株は、このような癌悪液質に関連する種々の液性因子を産生することが知られており、OCC-1細胞をメードマウスに移植すると、悪液質などの諸症状を発症させる (Kajimura N. et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 1996, 38 Suppl. pS48-52; Tanaka R. et al., Jpn. J. Clin. Oncology Apr. 1996, 26 (2) p88-94)。これは、メードマウスに移植されたOCC-1細胞株が、増殖と共に種々のサイト

カイン (G-CSF、IL-6、LIF、IL-11、PTHrP など) を産生し、これらの因子が複合的に作用して、上記諸症状を発症させると考えられる。

【0005】このように、OCC-1細胞株を移植したメードマウスの症状は、ヒト末期癌患者の症状ときわめて共通性が高いと考えられる。しかしながら、現在に至るまでこのような悪液質に対する薬剤についての報告は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、PTHrPとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、悪液質に対する治療剤を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質により、目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤である。上記悪液質としては癌由来のものが挙げられる。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein: PTHrP) とその受容体 (PTHrP受容体) との結合を阻害する物質を有効成分として含む悪液質治療剤である。本明細書中で「PTHrP受容体」とは、例えば特表平6-506598号公報に記載されているPTHrPと結合する受容体を指し、標的器官上 (例えば骨や腎臓) に存在するPTHrP受容体か否かを問わない。

【0009】また、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」とは、PTHrPに結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質 (例えば抗PTHrP抗体)、およびPTHrP受容体に結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質 (例えばPTHrP受容体に対するアンタゴニスト (PTHrPアンタゴニストともいう)、具体的にはPTHrPペプチドの少なくとも一つのアミノ酸を置換、欠失したものやPTHrPペプチドの部分配列などを指す) のいずれか一方又は両方を指す。

【0010】抗PTHrP抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体 (W096/33735号公報) 又はキメラ抗体 (特開平4-228089号公報) などの公知の抗体のほか、本発明における抗体 (#23-57-137-1抗体) などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。また、PTHrPアンタゴニストとしては、ポリペプチドや低分子を含むが、例えばPTHrPに対して拮抗的にPTHrP受容体に結合する物質、例えば特開平7-165790号公報、Peptides (UNITED STATE

S) 1995, 16 (6) 1031-1037, Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28/1992, 31 (16) 4026-4033、特表平5-50909 8号公報に記載のPTHrPアンタゴニスト活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、上記例示のポリペプチドのうち、少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、付加、挿入されたポリペプチドで、同等のPTHrPアンタゴニスト活性を有するものも本発明のPTHrPアンタゴニストに含まれる。本発明では、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」として抗PTHrP抗体を例に説明する。

【0011】1. 抗PTHrP抗体

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、悪液質の治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問うものではない。

【0012】本発明で使用される抗PTHrP抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗PTHrP抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はPTHrPと結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体に結合するのを阻害してPTHrPのシグナル伝達を遮断し、PTHrPの生物学的活性を阻害する抗体である。

【0013】このような抗体としては、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1により産生される#23-57-137-1抗体が挙げられる。なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0014】2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、PTHrPを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0015】具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトPTHrPを、Suva, I. J. et al., Science (1987) 237, 893に開示されたPTHrP遺伝子クローンアミノ酸配列を発見することによって得る。すなわち、PTHrPをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のPTHrPタンパク質を公知の方法で精製する。

【0016】次に、この精製PTHrPタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PTHrPのN末端の34個のアミノ酸について、化学合成により作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

【0017】感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

10 【0018】感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0019】前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。

【0020】前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルズ・テイラーの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0021】免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエロー

マ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0022】細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000-6000程度) を通常30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

【0023】このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、数日~数週間) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

【0024】また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでPTHrPに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrPへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるPTHrPを投与して抗PTHrP抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からPTHrPに対するヒト抗体を取得してもよい (国際特許出願公開番号WO 94/25585号公報、WO 93/12227号公報、WO 92/03918号公報、WO 94/02602号公報参照)。

【0025】このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0026】3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる (例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem.

(1990) 192, 767-775, 1990参照)。

【0027】具体的には、抗PTHrP抗体を産生するハイブリドーマから、抗PTHrP抗体の可変 (V) 領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニニン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0028】得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-AmpliFINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

【0029】得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認する。

【0030】目的とする抗PTHrP抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C領域) をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。本発明で使用される抗PTHrP抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

【0031】抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523号公報参照)。

【0032】また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質 (ヤギβカゼインなど) をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその

子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., *Bio/technology* (1994) 12, 699-702)。

【0033】4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化 (humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコートするDNAをヒト抗体C領域をコートするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0034】ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

【0035】具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコートするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体が得られる (EP 239400号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

【0036】CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の変換領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

【0037】キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

【0038】キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の変換領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域お

よびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

【0039】本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23 57 137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23 57 137-1抗体は、マウス由来の#23 57 137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体HSU03868 (GEN BANK, Deftos Mら, *Scand. J. Immunol.*, 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1、FR2およびFR3) 並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier AMら, *Eur. J. Immunol.*, 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

【0040】なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコートするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月15日に、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌である *Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq λ /pUC19) についてはFERM BP-5630として、プラズミド条約に基づきそれぞれ国際寄託されている。

【0041】5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、PTHrPに結合し、PTHrPの活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(a b')₂、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパepsin、パepsinで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコートする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., P

40 lueckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoy i, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137参照)。

【0042】scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはベンジチリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883)。sc

FvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリinkerとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0043】 scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリinker部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0044】 また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

【0045】 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗PTHrP抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0046】 6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター、エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター、エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0047】 また、その他に本発明で使用する抗体発現に使用できるプロモーター、エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウイルスプロモーター、エンハンサー、あるいはヒトエロシゲーションファクター1α (HEF1α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター、エンハンサー等が挙げられる。

【0048】 SV 40プロモーター/エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1αプロモーター/エンハンサー

を使用する場合はMizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

【0049】 大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

【0050】 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

【0051】 複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0052】 本発明で使用する抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。好ましくは、本発明で使用する抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

【0053】 次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0054】 7. 抗体の分離、精製
前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose E、(Pharmacia製) 等が挙げられる。その他、通常のタ

ンバク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

【0055】8. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガントレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

【0056】本発明で使用される抗PTHrP抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、PTHrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗PTHrP抗体を含む試料、例えば、抗PTHrP抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。本発明で使用される抗体の活性を確認するには、抗PTHrP抗体の中和活性を測定する。

【0057】9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、悪液質に対する治療又は改善を目的として使用される。また、悪液質の種類は癌由来のものであるか否かを問わない。例えば、癌由来のものとして、J. Urol. (UNITED STATES) Mar 1995, 153 (3 Pt 1) p854-857, Langenbecks Arch. Chir. Suppl II Verh Dtsch Ges Chir (GERMANY) 1990, p261-265, Oncology (SWITZERLAND) 1990, 47 (1) p87-91, Int. J. Pancreatol. (UNITED STATES) Aug-Nov 1990, 7 (1-3) p141-150, J. Natl. Cancer Inst. (UNITED STATES) Dec 19, 1990, 82 (24) p1922-1926などに記載の悪液質が挙げられる。

【0058】また、癌由来でないものとして、JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. (UNITED STATES) Nov-Dec 1990, 14 (6) p605-609, Chest (UNITED STATES) Nov 1990, 98 (5) p1091-1094, Bone Marrow Transplant. (ENGLAND) Jul 1990, 6 (1) p53-57などに記載の悪液質が挙げられる。

【0059】本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する治療剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には経肺剤型 (例えばネブライザーなどの器具を用いた経肺投与剤)、経鼻投与剤型、経皮投与剤型 (例えば軟膏、クリ

ーム剤)、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の例としては、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mg から1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01~100000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗PTHrP抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0060】また、投与時期としては、悪液質が生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよい。本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

【0061】このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

【0062】実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗PTHrP抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、セラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤型とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0063】

【実施例】以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例等にその技術的範囲を限定するものではない。

【実施例1】悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍（メーダマウス移植系）の悪液質モデル動物を用

10

20

30

40

50

いて、PTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の悪液質に対する治療効果を検討した。モデル動物としてヒト口腔底癌OCC-1 ((財) 実験動物中央研究所より購入) を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌OCC-1を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌OCC-1によって引き起こされる悪液質症状を、マウスモノクローナル抗体が改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

【0064】ヒト口腔底癌OCC-1の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本クレア) を用いてin vivoで行った。薬効評価には、6週齢雄性BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本クレア) を購入し、1週間の馴化の後、7週齢の動物を使用した。悪液質モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト口腔底癌OCC-1を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、血中カルシウム濃度、体重および腫瘍体積を指標として各指標が平均化するように群分けし、悪液質モデル動物とした。悪液質に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。

【0065】(1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、マウスモノクローナル抗体を週2回投与して、生存期間の観察を行った。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート (アレディア) を、15mg/Kgの用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を0.2ml/mouseで尾静脈内に週2回投与した。その結果を図1に示す。

【0066】(2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス1匹あたり10 μ gまたは100 μ gのPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体を尾静脈内に2日おきに2回投与した。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート (アレディア) を、15mg/Kgの用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を0.2ml/mouseで尾静脈内に2日おきに2回投与した。

【0067】(3) 血中カルシウムの測定

マウスモノクローナル抗体投与後、1日および4日目に血中カルシウム濃度を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりハマトクリット管で採血し、643自動Ca/pHアナライザー (CIBA-CORNING) を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。体重は、抗体投与後4日目まで毎日測定した。その結果を、図2および図3に示す。

【0068】(4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、抗体投与後4日目に、腫瘍の長径 (a mm)

および短径 (b mm) を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により腫瘍体積として算出した。その結果を、図4に示す。

【0069】以上の結果より、血中カルシウム濃度については、抗体濃度10 μ gでは、パミドロネート投与群と差がないにも関わらず、悪性腫瘍に伴う体重減少をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。抗体濃度100 μ gを投与した群では、血中カルシウム濃度の上昇をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制し、体重減少もパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。また、抗PTHrP中和抗体100 μ gを週2回投与した群では、パミドロネート投与群又は対照群に比べて有意な生存期間の延長 ($p=0.0003$: Log Rank test) が認められた。このことから、PTHrPに対する中和マウスモノクローナル抗体は体重減少抑制、生存期間の延長など既存の高カルシウム血症治療薬にはない効果を有する。したがって本抗体の悪性腫瘍に伴う悪液質の治療薬としての有用性が示された。

【0070】〔実施例2〕高カルシウム血症・悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍-ヌードマウス移植系の悪液質モデル動物を用いて、PTHrPに対するヒト型化抗体バージョンqの悪液質に対する治療効果を検討した。モデル動物としてヒト口腔底癌OCC-1 ((財) 実験動物中央研究所より購入) を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌OCC-1を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌OCC-1によって引き起こされる悪液質症状を、ヒト型化抗体バージョンqが改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

【0071】ヒト口腔底癌OCC-1の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本クレア) を用いてin vivoで行った。薬効評価には、6週齢雄性BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本クレア) を購入し、1週間の馴化の後、7週齢の動物を使用した。悪液質モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト口腔底癌OCC-1を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、悪液質モデル動物とした。悪液質に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。

【0072】(1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、ヒト型化抗体バージョンqを週2回尾静脈内に投与して、生存期間の観察を行った。対照として、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を0.1ml/mouseで尾静脈内に週2回投与した。その結果を図16に示す。

【0073】(2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス1匹あたり10 μ gまたは100 μ gのヒト型化抗体バージョンqを尾静脈内に2日あけて2回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水(PBS)を0.1ml/mouseで同様に投与した。

【0074】(3) 血中カルシウムの測定

ヒト型化抗体バージョンq初回投与後、1日および4日目に血中カルシウム濃度を測定し、抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりハマトクリット管で採血し、643自動Ca/pHアナライザー(CHIRON)を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。体重は、4日目まで毎日測定した。その結果を、図17および図18に示す。

(4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、初回投与時および4日目に、腫瘍の長径(a mm)および短径(b mm)を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により算出した。その結果を図19に示す。

【0075】以上の結果のように、ヒト型化抗体バージョンqを10 μ gあるいは100 μ gを投与することで、悪性腫瘍に伴う血中カルシウム濃度の上昇及び体重の減少は対照群に比べて抑制された。また、ヒト型化抗体バージョンqを100 μ g、週2回投与し続けた場合、対照群に比べて有意な生存期間の延長($p=0.0108$: Log Rank test)が認められた。今回のヒト型化抗体バージョンqの悪性腫瘍に伴う悪液質モデル動物に対する効果は、すでに報告したマウスモノクローナル抗体の効果と同様のものであった。このことから、本抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症・悪液質の治療薬としての有用性が示された。

【0076】〔参考例1〕

抗PTHrP(1-34)マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒトPTHrP(1-34)(配列番号75)に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#23-57-154および#23-57-137-1を、佐藤幹二らにより作製された(Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993)。免疫原として使用するために、PTHrP(1-34)(Peninsula製)とキャリアタンパクであるサイログロブリンをカルボシミド(Dojin)を用いて結合した。サイログロブリンと結合したPTHrP(1-34)を透析し、タンパク濃度として2 μ g/mlとなるように調製した後、フロイントアジュバント(Difco)と1:1で混合し、エマルジョン作製後、16匹の雌性BALB/Cマウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり100 μ gを11回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

【0077】免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より

採血し、血清分離後RIAバッファーで希釈した抗血清と125I標識PTHrP(1-34)を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していないPTHrP(1-34)を動物あたり50 μ gを最終免疫した。

【0078】最終免疫3日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株P3x63Ag8U.1を50%ポリエチレングリコール4000を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を 2×10^4 ウェルの細胞数で85枚の96穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別はHAT培地を用いて行った。

【0079】ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化RIA法にてPTHrP認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15%FCSを含むRPMI-1640培地にOPI-supplement(Sigma)を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP(1-34)との結合能の強いクローン#23-57-154および#23-57-137-1を得た。なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月15日に、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0080】〔参考例2〕ヒトPTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

ヒトPTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローニングした。

(1) mRNAの調製

ハイブリドーマ#23-57-137-1からのmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech社)を用いて調製した。ハイブリドーマ#23-57-137-1の細胞をExtraction Bufferで完全にホモニサイズし、キット添付の処方に従い、oligo(dT)-Cellulose Spun ColumnにてmRNAを精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA沈殿物をElution Bufferに溶解した。

【0081】(2) マウスH鎖V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製および増幅

(a) #23-57-137-1抗体H鎖V領域cDNAのクローニング
ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'RACE法には5' Ampli FINDER RACE kit(CLONETECH社)を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA合成に使用するプライマー

は、マウスH鎖定常領域(C領域)とハイブリダイスするMHC2プライマー(配列番号1)を用いた。前記のようにして調製したmRNA約2 μ gを鋳型としてMHC2プライマー10pmoleを加え、逆転写酵素と52℃、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

【0082】6N NaOHでRNAを加水分解(65℃、30分間)した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。T4RNAリガーゼで37℃で6時間、室温で16時間反応することにより、合成したcDNAの5'末端にAmplifINDER Anchor(配列番号42)を連結した。これを鋳型としてPCRにより増幅するためのプライマーとしてAnchorプライマー(配列番号2)およびMHC-G1プライマー(配列番号3)(S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。PCR溶液は、その50 μ l中に10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl₂、2.5ユニットのTakara Taq(宝酒造)、10pmoleのアンカー(Anchor)プライマー、並びにMHC-G1プライマー及びAmplifINDER Anchorを連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有する。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Mode 1480J(Perkin Elmer)を用い、94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。

【0083】(ii) #23-57-137-1抗体L鎖V領域のcDNAのクローニング

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法には5'-AmplifINDER RACE Kit(Clonetech)を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA合成に使用するプライマーは、oligo-dTプライマーを用いた。前記のように調製したmRNA約2 μ gを鋳型としてoligo-dTプライマーを加え、逆転写酵素と52℃、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。6N NaOHでRNAを加水分解(65℃、30分間)した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。合成したcDNAの5'末端に前記AmplifINDER AnchorをT4RNAリガーゼで37℃で6時間、室温で16時間反応させることにより連結した。

【0084】マウスL鎖定常領域の保存配列からPCRプライマーMLC(配列番号4)を設計し、394 DNA/RNAセンササイザー(ABI社)を用いて合成した。PCR溶液は、その100 μ l中に10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl₂、2.5ユニットのAmpliTaq(Perkin Elmer)、50pmoleのAnchorプライマー(配列番号2)、並びにMLC(配列番号4)およびAmplifINDER Anchorを連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有す

る。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model480J(Perkin Elmer)を用い、94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで35回行った。

【0085】(3) PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を3% NuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H鎖V領域として約550bp長、L鎖V領域として約550bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(B10101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素XmaI(New England Biolabs)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素EcoRI(宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。こうして、5'末端にEcoRI認識配列を有し、3'末端にXmaI認識配列を有するマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。

【0086】上記のようにして調製したマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-XmaI DNA断片とEcoRI及びXmaIで消化することにより調製したpUC19ベクターをDNAライゲーションキットver.2

(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。次に10 μ lの上記連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ lに加え、この細胞を氷上で15分間、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで300 μ lのSOC培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加え37℃にて30分間インキュベートした後、100 μ g/ml又は50 μ g/mlのアンプシリン、0.1mMのIPTG、20 μ g/mlのX-galを含むLB寒天培地または2xYT寒天培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0087】この形質転換体を100 μ g/ml又は50 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地または2xYT培地2mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機PI 100 Σ (アラバウ)又はQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

【0088】(4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A(ABI社Perkin Elmer)によ

10

20

30

40

50

り決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号5) 及びM13 Primer RV (宝酒造) (配列番号6) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0089】こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1H04、L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1L24と命名した。プラスミドMBC1H04 およびMBC1L24 に含まれるマウス#23-57-137-1抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む)をそれぞれ配列番号57、65に示す。H鎖V領域及びL鎖V領域断片のポリヌクレオチドは、ともに配列番号57、65で表される塩基配列の第58番目(グルタミンをコードする)から開始されている。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域の断片については配列番号46、L鎖V領域の断片については配列番号45に示す。

【0090】なお、前記プラスミドMBC1H04 およびMBC1L24 を有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (MBC1H04) およびEscherichia coli JM109 (MBC1L24) として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109 (MBC1H04)についてはFERM BP-562 *

*8、Escherichia coli JM109 (MBC1L24)についてはFERM BP 5627としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0091】(5) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定
H鎖V領域およびL鎖V領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良好に保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示すごとく決定した。なお、L鎖V領域のCDR1~3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号59~61に示し、H鎖V領域のCDR1~3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号62~64に示した。

【0092】

【表1】

表1

V領域	配列番号	CDR 1	CDR 2	CDR 3
H鎖V領域	57	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	65	23-34	50-60	93-105

【0093】〔参考例3〕キメラ抗体の構築

(1) キメラ抗体H鎖の構築

(a) H鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1 γ -S1 (配列番号7) はV領域のリーダー配列の5'側をコードするDNAにハイブリタイズし且つKozak コンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。前方プライマーMBC1 γ -a (配列番号8) はJ領域の3'側をコードするDNA配列にハイブリタイズし、且つ、スプライドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.07 μ gのプラスミドMBC1H04、プライマーとしてMBC1 γ -aおよびMBC1 γ -S1をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添加緩衝液を使用して50 μ lの鉱油を上層し、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sie

ve GTGアガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0094】437bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(B10101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素BamHI、Hind III (宝酒造)により37℃1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

【0095】上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するHind III BamHI DNA断片をHind IIIおよびBamHIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマーM13 Primer M4 およびM13 Primer RVをプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含

有し、5' 側にHind III認識配列及びKozak 配列、3' 側にBamHI認識配列を持つプラスミドをMBC1H/pUC19 と命名した。

【0096】(i) cDNAタイプのマウス ヒトキメラH鎖の作製のためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。H鎖V領域のための後方プライマーMBC1HVS2 (配列番号9) はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番のアスパラギンをグリニンに変換し、且つKozak コンセンサス配列 (Kozak, M et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びにHind IIIおよびEcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2 (配列番号10) はJ領域の3' 側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5' 側の配列をコードしApa IおよびSma I認識配列を有するように設計した。

【0097】PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 μ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taq を2.5U、0.25mMのd N T P含む条件で添付の緩衝液を使用して50 μ lの鉱油を上層して94 $^{\circ}$ C 1分間、55 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem GTG アガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。456bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。

【0098】得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素EcoRI およびSmaI (宝酒造)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドマ#23-57-137-11に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5' 側にEcoRI およびHind III認識配列及びKozak 配列、3' 側にApa IおよびSma I認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

【0099】(ii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C γ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域I γ G1のゲノムDNA

(N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- Δ E RVh-PM1-f (W092/19759参照)と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a (W092/19759参照)とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

【0100】DHFR- Δ E-RVh-PM1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 α プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI 部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-BamHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI 部位が欠失したDHFR- Δ E-RVh-PM1-fをHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

【0101】ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含み、5' 末端にEcoRI およびHind III認識配列、3' 末端にBamHI認識配列を持つ。

【0102】プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh γ I (W092/19759参照)から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI NotI BamHI Adaptor (宝酒造)を連結することにより構築した。

【0103】さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミドMBC1HcDNA/pUC1

9 をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体L鎖配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMB ClHeDNA/pCHO1 と命名した。なお、発現ベクターpCHO1は、DHFR⁺ 6E-rrvH PM1 f (W092/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

【0104】(2) ヒトL鎖定常領域の構築

(i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含むpUC19 ベクターを構築するために、Hind III部位欠失pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター2 μ g を20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100 mM KCl、8UのHind III (宝酒造) を含有する反応混合液20 μ l 中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿により回収した。回収したDNAを50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6Uのクレノウ(Klenow) フラグメント (GIBCO BRL) を含有する50 μ l の反応混合液中で室温にて20分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクターDNAをエタノール沈殿により回収した。

【0105】回収したベクターDNAを50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、5% (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 UのT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL) を含有する反応混合液10 μ l 中で16℃で2時間反応させ、自己連結させた。反応混合液5 μ l を大腸菌JM109 コンピテント細胞 (ニッポンゲン) 100 μ l に加え、氷上で30分間静置した後、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。SOC培地500 μ l を加えて、37℃で1時間インキュベーションした後、X-gal とIPTGを表面に塗布した2 \times YT寒天培地 (50 μ g/mlアンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にまき、37℃で一晩培養して形質転換体を得た。形質転換体を、50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地20mlで37℃一晩培養し、菌体画分からPlasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付の処方に従ってプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドをHind IIIで消化し、Hind III部位が欠失していることを確認したプラスミドをpUC19 Δ Hind IIIと命名した。

【0106】(ii) ヒトL鎖入鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

ヒト抗体L鎖入鎖C領域は、Mcg + Ke + Oz⁺、Mcg + Ke + Oz⁻、Mcg + Ke + Oz⁺、Mcg + Ke + Oz⁻の少なくとも4種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U

SA, 84, 9074-9078, 1987)。#23-57-137-1マウスL鎖入鎖C領域と相同性を有するヒト抗体L鎖入鎖C領域をEMBLデータベースで検索した結果、アイソタイプがMcg + Ke + Oz⁺ (accession No. X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)のヒト抗体L鎖入鎖C領域が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1マウスL鎖入鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

【0107】そこで、このヒト抗体L鎖入鎖C領域をコードする遺伝子の構築をPCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA 合成機 (ABI社) を用いて行った。HLAMB1 (配列番号11) およびHLAMB3 (配列番号13) はセンスDNA配列を有し、HLAMB2 (配列番号12) およびHLAMB4 (配列番号14) はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を有する。

【0108】外部プライマーHLAMBS (配列番号15)、HLAMBR (配列番号16) はHLAMB1、HLAMB4とそれぞれ相同な配列を有しており、またHLAMBSはEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、HLAMBRはEcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一PCRでHLAMB1-HLAMB2 とHLAMB3-HLAMB4 の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

【0109】PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を使い、添付の処方に従って行った。第一PCRでは、5pmole のHLAMB1および0.5pmole のHLAMB2と5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100 μ l の反応混合液、あるいは0.5pmoleのHLAMB3および5pmole のHLAMB4と5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。

【0110】第二PCRは、反応液を50 μ l ずつ混合し、50 μ l の鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。第三PCRは、反応液に外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを各50pmole ずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物のDNA断片を3%低融点アカロースゲル (NuSieve GTG Agarose, FMC) で電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、添付の処方に従ってゲルから回収、精製した。

【0111】得られたDNA断片を50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、8UのEcoRI (宝酒造) を含有する20 μ l の反応混合液中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液8 μ l に溶解し

た。

【O 1 1 2】プラスミドpUC19 ΔHind III 0.8 μgを同様にEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミドpUC19 ΔHind IIIを50 mM Tris HCl (pH9.0)、1 mM MgCl₂、アルカリホスファターゼ(E. coli C75, 宝酒造)を含有する反応混合液50 μl中で37℃、30分間反応させ脱リン酸処理(BAP処理)した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿により回収した後、10 mM Tris HCl (pH7.4)、1 mM EDTA溶液10 μlに溶解した。

【O 1 1 3】上記のBAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind III 1 μlと先のPCR産物4 μlをDNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造)を用いて連結し、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mlアンピシリンを含有する2 × YT培地2 mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【O 1 1 4】上記プラスミドについて、クローニングされたDNAの塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には373A DNA シークエンサー (ABI社)を用い、プライマーにはM13 Primer M4 およびM13 Primer RV (宝酒造)を用いた。その結果、クローニングされたDNAの内部に12bpの欠失があることが判明した。このDNAを含むプラスミドをC Δ/pUC19と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマーHCLMS (配列番号17)、HCLMR (配列番号18)を新たに合成し、PCRで再度正しいDNAの構築を行った。

【O 1 1 5】第一PCRで欠失DNAを含むプラスミドC Δ/pUC19を鋳型とし、プライマーHLAMBSとHCLMR、HCLMSとHLAMB4で反応を行った。PCR産物をそれぞれ精製し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMB4を添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

【O 1 1 6】第一PCRでは、鋳型としてC Δ/pUC19 0.1 μg、プライマーHLAMBSおよびHCLMR 各50 pmole、あるいはHCLMS およびHLAMB4各50 pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【O 1 1 7】PCR産物HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp)をそれぞれ3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。第二PCRでは精製DNA断片各40 ng、1 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する20 μlの反応混合液を用い、25 μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行った。

【O 1 1 8】第三PCRでは、第一PCR反応液2 μl、外部

プライマーHLAMBS、HLAMB4各50 pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鉱油を上層した。PCRは、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物である357bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【O 1 1 9】得られたDNA断片0.1 μgをEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind IIIにサブクローニングした。大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50 μg/mlアンピシリンを含有する2 × YT培地2 mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドについて塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造)を用い、373A DNA シークエンサー(ABI社)にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC Δ/pUC19とした。

【O 1 2 0】(iii) ヒトL鎖κ鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

プラスミドHEF-PM1k-gk (WO92/19759) からL鎖κ鎖C領域をコードするDNA断片をPCR法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA 合成機(ABI社)を用いて合成した前方プライマーHKAPS (配列番号19)はEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、後方プライマーHKAPA (配列番号20)はEcoRI 認識配列を有するように設計した。鋳型となるプラスミドHEF-PM1k-gk 0.1 μg、プライマーHKAPS、HKAPA 各50 pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鉱油を上層した。94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の反応を30サイクル行った。360bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【O 1 2 1】得られたDNA断片をEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind IIIにクローニングした。大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換し、50 μg/mlアンピシリンを含有する2 × YT培地2 mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドの塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造)を用い、373A DNA シークエンサー(ABI社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC κ/pUC19とした。

【O 1 2 2】(3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築
キメラ#23 57-137 1抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミドC Δ/pUC19、C κ/pUC19のヒト抗体定常領域の直前にあるHind III、BlnI部位に、#23 57-137 1 L鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23 57-137 1抗体L鎖V領域および

L鎖入鎖またはL鎖κ鎖定常領域をコードするpUC19ベクターを作製した。EcoRI消化によってキメラ抗体L鎖遺伝子を切り出し、HEF発現ベクターへサブクローニングを行った。

【0123】すなわち、プラスミドMBC1L24から#23-57-137-1抗体L鎖V領域をPCR法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA合成機(ABI社)を用いて行った。後方プライマーMBCCHL1(配列番号21)はHind III認識配列とKozak配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)を、前方プライマーMBCCHL3(配列番号22)はBglII、EcoRI認識配列を有するように設計した。

【0124】PCRは、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.1 μgのMBC1L24、プライマーとしてMBCCHL1およびMBCCHL3を各50pmole、1 μlのAmpliTaQ(PERKIN ELMER)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鉱油を上層して94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。444bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μlに溶解した。PCR産物1 μlをそれぞれ10mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、8 UのHind III(宝酒造)および8 UのEcoRI(宝酒造)を含有する反応混合液20 μl中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液8 μlに溶解した。

【0125】プラスミドpUC19 1 μgを同様にHind IIIおよびEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ(E. coli C75、宝酒造)でBAP処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液10 μlに溶解した。

【0126】BAP処理したプラスミドpUC19 1 μlと先のPCR産物4 μlをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造)を用いて連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンケン)に前述と同様に形質転換した。これを50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT寒天培地にまき、37℃で一晩培養した。得られた形質転換体を、50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで37℃で一晩培養した。菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドをCHL/pUC19とした。

【0127】プラスミドCλ/pUC19、Cκ/pUC19各1 μgをそれぞれ20mM Tris HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8 UのHind III(宝酒造)お

よび2 UのBlnI(宝酒造)を含有する反応混合液20 μl中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、37℃で30分間BAP処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液10 μlに溶解した。#23-57-137-1L鎖V領域を含むプラスミドCHL/pUC19から8 μgを同様にHind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液10 μlに溶解した。

【0128】このL鎖V領域DNA 4 μlをBAP処理したプラスミドCλ/pUC19またはCκ/pUC19各1 μlにサブクローニングし、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地3mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドMBC1L(λ)/pUC19、MBC1L(κ)/pUC19とした。プラスミドMBC1L(λ)/pUC19およびMBC1L(κ)/pUC19をそれぞれEcoRIで消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bpのDNA断片をGENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液10 μlに溶解した。

【0129】発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7 μgをEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した。回収したDNA断片をBAP処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bpのDNA断片をGENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液10 μlに溶解した。BAP処理したHEFベクター2 μlを上記プラスミドMBC1L(λ)またはMBC1L(κ)EcoRI断片各3 μlと連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【0130】精製したプラスミドを、20mM Tris HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8 UのHind III(宝酒造)および2 UのPvuI(宝酒造)を含有する反応混合液20 μl中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれMBC1L(λ)/neo、MBC1L(κ)/neoとした。

【0131】(4) COS-7細胞のトランスフェクション
キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発

10

20

30

40

50

現させた。すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミドMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L (λ) neoまたはMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L (κ) neoの組み合わせで、Gene Pulser装置 (BioRad) を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS (-) 中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8 ml に、各プラスミドDNA $10 \mu\text{g}$ を加え、1,500 V, $25 \mu\text{F}$ の静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清 (GIBCO) を含有するDMEM培地 (GIBCO) に懸濁し、10 cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。また、COS-7細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPS11キット (BioRad) を用いてキット添付の処方に従って行った。

【0132】(5) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートは次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO₃, 0.02% Na₂S₂O₈) で $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) $100 \mu\text{l}$ で固相化し、200 μl の希釈バッファー (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% Na₂S₂O₈, 1% 牛血清アルブミン (BSA), pH7.2) でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) $100 \mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104, p-ニトロフェニルリン酸, SIGMA) を加え、次に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。濃度測定のスランダーとして、Hu IgG1 λ Purified (The Binding Site) を用いた。

【0133】(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヒトPTHrP (1-34) (Genzyme研究所) $100 \mu\text{l}$ で固相化した。200 μl の希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20

で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) $100 \mu\text{l}$ を加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104, p-ニトロフェニルリン酸, SIGMA) を加え、次に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHrP (1-34) に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された (図5)。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が κ 鎖あるいは λ 鎖のいずれであっても抗体のPTHrP (1-34) に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 κ 鎖を用いて構築した。

【0134】(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞 (DXB11) に導入した。すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドMBC1HcDNA-pCHO1とMBC1L (λ) neoまたはMBC1HcDNA-pCHO1とMBC1L (κ) neoの組み合わせで、Gene Pulser装置 (BioRad) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS (-) 中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8 ml に、各プラスミドDNA $10 \mu\text{g}$ を加え、1,500 V, $25 \mu\text{F}$ の静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清 (GIBCO) を添加したMEM- α 培地 (GIBCO) に懸濁し、3枚の96穴プレート (Falcon) を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM- α 培地 (GIBCO) の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

【0135】樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μm のフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROS/プロ

テインAカラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

【0136】〔参考例4〕ヒト型化抗体の構築

(I) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフトイングにより作製した。ヒト抗体S31679 (NBRF PDB, Cuisinier A. M. ら, Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) 由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖 (バージョンa) の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフトイングプライマーMBC1HGP1 (配列番号23) 及びMBC1HGP3 (配列番号24) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフトイングプライマーMBC1HGP2 (配列番号25) 及びMBC1HGP4 (配列番号26) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1HVS1 (配列番号27) 及びMBC1HVR1 (配列番号28) はCDRグラフトイングプライマーMBC1HGP1及びMBC1HGP4とホモロジーを有する。

【0137】CDR-グラフトイングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にて行った。

【0138】すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフトイングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20μlの10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mMEDTA溶液に溶解した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、100μlの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフトイングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4をそれぞれ1μl、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに50pmoleの外部プライマーMBC1

HVS1及びMBC1HVR1を加え、同じ温度サイクルを30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を4% NuSieveGTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0139】421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20μlに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhMBCHV/pUC19と命名した。

【0140】(ii) ヒト型化H鎖cDNAのためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域Cγ1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV領域のリーダー配列の5'側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M. ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIIIおよびEcoRI認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2はJ領域の3'側をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つC領域の5'側の配列をコードしApaIおよびSmaI認識配列を有するように設計した。

【0141】PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、鋳型DNAとして0.4μgのhMBCHV/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3% NuSieveGTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0142】456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20μlに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRIおよびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドマ#23-57-137-1由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含

有し、5'側にEcoRIおよびHindIII認識配列及びKozak配列、3'側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをhMBC1Hv/pUC19と命名した。

【0143】(2) ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

hPM1抗体H鎖cDNAの配列を含むプラスミドRVh

PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIにて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。

このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域Cy1を含み、5'末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒト型化H鎖バージョン"a"の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。

【0144】hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。

【0145】(3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築
(i) FR1、2/FR3、4ハイブリッド抗体の作製
ヒト型化抗体とマウス(キメラ)抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。プラスミドhMBC1L(λ)/neo及びhMBC1L(λ)/neo各10μgを10mMTris-HCl(pH7.5)、10mMMgCl₂、1mMDTT、50mMNaCl、0.01%(w/v)BSA、AflIII(宝酒造)10Uを含有する反応混合液100μl中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドhMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L(λ)/neoから62

82bpの断片(h1とする)および1022bpの断片(h2とする)を、GENECLEANIIKit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【0146】回収したc1、h1断片各1μgについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mMTris-HCl(pH7.4)、1mMEDTA溶液10μlに溶解した。BAP処理したc1及びh1断片1μlをそれぞれh2、c2断片4μlに連結し(4℃、一夜)、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50μg/mlアンピシリンを含有する2xYT培地2mlで培養し、菌体画分からQ1AprepSpinPlasmidKit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【0147】精製したプラスミドを、10mMTris-HCl(pH7.5)、10mMMgCl₂、1mMDTT、ApaI(宝酒造)2U、またはBamHI(宝酒造)8U、HindIII(宝酒造)8Uを含有する反応混合液20μl中で37℃、1時間消化した。c1-h2が正しく連結されていれば、ApaIで5560-1246-1498bp、BamHI-HindIIIで7134-1269bpの消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

【0148】これをヒトFR1、2/マウスFR3、4ハイブリッド抗体L鎖をコートする発現ベクターをhMBC1L(λ)/neoとした。一方、h1-c2のクローンが得られなかったため、pUCベクター上で組換えてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Laλ/pUC19、及びFR3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Ldλ/pUC19を鋳型として用いた。

【0149】プラスミドhMBC1L(λ)/pUC19、hMBC1Laλ/pUC19及びhMBC1Ldλ/pUC19の各10μgを10mMTris-HCl(pH7.5)、10mMMgCl₂、1mMDTT、50mMNaCl、0.01%(w/v)BSA、HindIII16U、AflIII4Uを含有する反応混合液30μl中で37℃、1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドhMBC1L(λ)/pUC19から215bp(c2')、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19からそれぞれ3218bp(ha1'、hd1')のDNA断片をGENECLEANIIKit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【0150】ha1'、hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質

転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQ1Aprep Spin Plasmid Kit (Q1AGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドm/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19とした。得られたプラスミドm/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19をEcoRIで消化した。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。

【0151】各DNA断片4 μ lを前述のBAP処理したHEF-ベクター1 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQ1Aprep Spin Plasmid Kit (Q1AGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、HindIII (宝酒造) 8U、PvuI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104、2195bp、逆方向に挿入されていれば4378、2926bpの消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウスFR1、2、ヒトFR3、4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hMBC1La λ /neo、m/hMBC1Ld λ /neoとした。

【0152】(ii) FR1/FR2ハイブリッド抗体の作製
CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。プラスミドMBC1L(λ)/neo及びh/mMBC1L(λ)/neoの各10 μ gを10mM Tris-HCl (pH7.9)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、0.01% (w/v) BSA、SnaBI (宝酒造) 6Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。次に20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、0.01% (w/v) BSA、PvuI 6Uを含有する反応混合液50 μ l中で37℃にて1時間消化した。

【0153】反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L(λ)/neoから4955bp (m1) および2319bp (m2)、プラスミドh/mMBC1L(λ)/neoから4955bp (hm1) および2349bp (hm2) の各DNA断片をGENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。

【0154】m1、hm1断片1 μ lをそれぞれhm2、m2断片4 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQ1Aprep Spin Plasmid Kit (Q1AGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、ApaI (宝酒造) 8U、またはApaI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。

【0155】各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaIで5560/1246/498bp (m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaIで3535/2025/1246/498bp (hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒトFR1/マウスFR2、3、4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmmMBC1L(λ)/neo、マウスFR1/ヒトFR2/マウスFR3、4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hmMBC1L(λ)/neoとした。

【0156】(4) ヒト型化抗体L鎖の構築
ヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖を、PCR法によるCDRグラフトニングにより作製した。ヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK、Defetos Mら、Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来のFR1、FR2およびFR3、並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB)由来のFR4を有するヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖(バージョン"a")の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。

【0157】CDRグラフトニングプライマーMBC1LGP1 (配列番号29) 及びMBC1LGP3 (配列番号30) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフトニングプライマーMBC1LGP2 (配列番号31) 及びMBC1LGP4 (配列番号32) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1LVS1 (配列番号33) 及びMBC1LVR1 (配列番号34) はCDRグラフトニングプライマーMBC1LGP1及びMBC1LGP4とホモロジーを有する。

【0158】CDRグラフトニングプライマーMBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。

【0159】各DNA断片4 μ lを前述のBAP処理したHEF-ベクター1 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQ1Aprep Spin Plasmid Kit (Q1AGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、ApaI (宝酒造) 8U、またはApaI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。

【0160】各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaIで5560/1246/498bp (m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaIで3535/2025/1246/498bp (hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒトFR1/マウスFR2、3、4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmmMBC1L(λ)/neo、マウスFR1/ヒトFR2/マウスFR3、4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hmMBC1L(λ)/neoとした。

ess, 1989)、ゲルからの抽出は *crush and soak* 法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にて行った。すなわち、それぞれ 1 nmol の CDR グラフティングプライマーを 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさの DNA 断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、*crush and soak* 法にてゲルから回収し $20\text{ }\mu\text{l}$ の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA 溶液に溶解した。

【0159】PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の反応混合液に上記の様に調製した CDR グラフティングプライマー MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 および MBC1LGP4 をそれぞれ $1\text{ }\mu\text{l}$ 、 0.25 mM の dNTP、 2.5 U の TaKaRa Ex Taq を含む条件で添付緩衝液を使用して 94°C にて 1 分間、 55°C にて 1 分間、 72°C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、この反応混合液に 50 pmol の外部プライマー MBC1LVS1 及び MBC1LVR1 を加え、さらに同じ温度サイクルで 30 回反応させた。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0160】 421 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドを hMBC1L/pUC19 と命名した。しかしながら CDR4 の 104 位 (Kabat の規定によるアミノ酸番号 96 位) のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマー MBC1LGP10R (配列番号 35) を設計し、合成した。PCR は TaKaRa Taq (宝酒造) を用い、 $100\text{ }\mu\text{l}$ の反応混合液に鋳型 DNA として $0.6\text{ }\mu\text{g}$ のプラスミド hMBC1L/pUC19、プライマーとして MBC1LVS1 及び MBC1LGP10R をそれぞれ 50 pmol 、 2.5 U の TaKaRa Ex Taq (宝酒造) 0.25 mM の dNTP を含む条件で添付の緩衝液を使用して $50\text{ }\mu\text{l}$ の鉱油を上層して 94°C にて 1 分間、 55°C にて 1 分間、 72°C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。 421 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得ら

れた PCR 反応混合物を BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングした。

【0161】M13 Primer M4 プライマー及び M13 Primer RV プライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドを HindIII および BlnI で消化し、 416 bp の断片を 1% アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEAN II Kit (BIO101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。得られた PCR 反応混合物を HindIII および BlnI で消化することにより調製したプラスミド Cλ/pUC19 に導入し、プラスミド hMBC1Laλ/pUC19 と命名した。このプラスミドを EcoRI で消化し、ヒト型化 L 鎖をコードする配列を含む配列をプラスミド pCOS1 に導入し、EF1α プロモーターの下流にヒト型化 L 鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドを hMBC1Laλ/pCOS1 と命名した。ヒト型化 L 鎖バージョン "a" の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) を配列番号 66 に示す。また、バージョン a のアミノ酸配列を配列番号 47 に示す。

【0162】バージョン "b" を PCR 法による変異導入を用いて作製した。バージョン "b" では 43 位 (Kabat の規定によるアミノ酸番号 43 位) のグリシンをプロリンに、49 位 (Kabat の規定によるアミノ酸番号 49 位) のリジンをアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマー MBC1LGP5R (配列番号 36) とプライマー MBC1LVS1 によりプラスミド hMBC1Laλ/pUC19 を鋳型として PCR を行い、得られた DNA 断片を BamHI および HindIII で消化し、pUC19 の BamHI、HindIII 部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素 HindIII および AflIII で消化し、HindIII および AflIII で消化した hMBC1Laλ/pUC19 と連結した。こうして得られたプラスミドを hMBC1Lbλ/pUC19 とし、このプラスミドを EcoRI で消化し、ヒト型化 L 鎖をコードする DNA を含む断片をプラスミド pCOS1 に導入し、EF1α プロモーターの下流にヒト型化 L 鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドを hMBC1Lbλ/pCOS1 と命名した。

【0163】バージョン "c" を PCR 法による変異導入を用いて作製した。バージョン "c" では 84 位 (Kabat の規定によるアミノ酸番号 80 位) のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマー MBC1LGP6S (配列番号 37) とプライマー M13 Primer RV によりプラスミド hMBC1Laλ/pUC19 を鋳型として PCR を行い、得られた DNA 断片を BamHI および HindIII で消化し、BamHI

およびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

【0164】塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1Laλ/pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Leλ/pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Leλ/pCOS1と命名した。

【0165】バージョン“d”、“e”及び“f”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に“a”、“b”、“c”バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーMS1(配列番号44)によりそれぞれhMBC1Laλ/pCOS1、hMBC1Lbλ/pCOS1、hMBC1Leλ/pCOS1を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したCλ/pUC19と連結した。

【0166】こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ldλ/pUC19、hMBC1Leλ/pUC19、hMBC1Lfλ/pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ldλ/pCOS1、hMBC1Leλ/pCOS1、hMBC1Lfλ/pCOS1と命名した。

【0167】バージョン“g”及び“h”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に“a”、“d”バージョンの36位(Kabatの規定によるアミノ酸番号36位)のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP9R(配列番号39)およびM13 Primer RVをプライマーとして用いて、hMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドCλ/pUC19に

サブクローニングした。このプラスミドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R(配列番号40)とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配列を含むプラスミドを順にhMBC1Lgλ/pUC19およびhMBC1Lhλ/pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lgλ/pCOS1およびhMBC1Lhλ/pCOS1と命名した。

【0168】バージョン“i”、“j”、“k”、“l”、“m”、“n”および“o”をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号41)とプライマーVIRV(λ)(配列番号43)によりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1Lgλ/pUC19にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pUC19(x=i, j, k, l, m, n, o)とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pCOS1(x=i, j, k, l, m, n, o)と命名した。バージョン“j”、“l”、“m”および“o”の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

【0169】バージョン“p”、“q”、“r”、“s”および“t”は、バージョン“i”、“j”、“m”、“l”または“o”のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン“h”を、各バージョン“i”、“j”、“m”、“l”または“o”とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミドhMBC1Lxλ/pCOS1(x=i, j, m, l, o)中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1Lhλ/pCOS1中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含む

Aor51H1断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"および"o"の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r"および"t"とし、得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pCOS1(x=p, q, s, r, t)と命名した。バージョン"q"、"r"、"s"および"t"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそ

【0171】

【表2】

表2 配列表における置換アミノ酸の位置
(Kabatの規定によるアミノ酸番号)

バージョン	36	43	45	47	49	80	87
a		P			D		
b						P	
c							I
d		P			D		I
e						P	I
f							
g	Y						I
h	Y						
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y			V	D		
n	Y			V	D		
o	Y		K				I
p	Y		K		D		I
q	Y		K		D		I
r	Y		K	V	D		I
s	Y			V	D		I
t	Y			V	D		I

【0172】表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19およびhMBC1Lqλ/pUC19を有する大腸菌はEscherichia coli JM109(hMBC1HcDNA/pUC19)およびEscherichia coli JM109(hMBC1Lqλ/pUC19)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109(hMBC1HcDNA/pUC19)についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109(hMBC1Lqλ/pUC19)についてはFERM BP-5630としてプラズミド条約に基づき国際寄託されている。

【0173】(5) COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリット抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。すなわちL鎖ハイブリット抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhMBC1Lλ/pCOS1(x=a~t)のいずれかの組み合わせをGenePulser装置(BioRad)を用いて、前記ハイブリット抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。また、COS-7細胞の培養上清が

*それぞれ配列番号71、72、73、74に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号52、53、54、55に示す。

【0170】プラスミドhMBC1Lqλ/pCOS1をHindIIIおよびEcoRIで消化し、HindIIIおよびEcoRIで消化したプラスミドpUC19にサブクローニングし、プラスミドhMBC1Lqλ/pUC19と命名した。ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表2に示す。

【0171】

【表2】

o、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1Ldλ/pneo、hMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L(λ)/neo、またはhMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L(λ)/neoとの組み合わせを、GenePulser装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に1×10⁷細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V、25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

【0174】ヒト型化#23-57-137-1抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhMBC1Lxλ/pCOS1(x=a~t)のいずれかの組み合わせをGenePulser装置(BioRad)を用いて、前記ハイブリット抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。また、COS-7細胞の培養上清が

らのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPS II キット (BioRad) を用いて、キット添付の処方に従って行った。

【0175】(6) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを決のようにして調製した。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO₃, 0.02% NaN₃) で1μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100μlで固相化し、200μlの希釈バッファー (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% NaN₃, 1% 牛血清アルブミン (BSA), pH 7.2) でブロッッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100μlを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG12 Purified (The Binding Site) を用いた。

【0176】(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1μg/mlの濃度に調製したヒトPTHrP (1-34) 100μlで固相化した。200μlの希釈バッファーでブロッッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100μlを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween 20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma 104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。

【0177】(7) 活性確認

(i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン"a"とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった (図6)。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバー

ジョン"a"で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン"a"をヒト型化抗体のH鎖として供した。

【0178】(ii) ハイブリッド抗体の活性

(ii-a) FR1, 2, FR3, 4ハイブリッド抗体

L鎖がh/mMBC1L (λ) の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1L a λあるいはm/hMBC1L d λの場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した (図7)。これらの結果は、FR3, 4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1, 2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(ii-b) FR1, FR2ハイブリッド抗体

L鎖がm/hmMBC1L (λ) の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L (λ) の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した (図8)。これらの結果は、FR1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

【0179】(iii) ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン"a"から"t"の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン"j", "l", "m", "o", "q", "r", "s", "t"を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHrP結合能を示した (図9~12)。

【0180】(8) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞 (DXB11) に導入した。すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMBC1HcDNA (pCHO1とhMBC1Lmλ-pCOS1またはhMBC1HcDNA (pCHO1とhMBC1Lqλ-pCOS1あるいはhMBC1HcDNA (pCHO1とhMBC1Lrλ-pCOS1の組み合わせで、Gene Pulser装置 (BioRad) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS (-) 中に1×10⁶細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清 (GIBCO) 添加、MEM-α培地 (GIBCO) に懸濁し、96穴プレート (Falcon) を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α

培地 (G I B C O) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定 E L I S A にて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

【0181】樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボットにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM- α 培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μ mのフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROSプロテインAカラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記 E L I S A 系にて測定した。

【0182】〔参考例5〕中和活性の測定
マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株 ROS 17/2.8-5 細胞を用いて行った。すなわち、ROS 17/2.8-5 細胞を、10%牛胎児血清 (G I B C O) を含む Ham' SF-12 培地 (G I B C O) 中にて、CO₂ インキュベーターで培養した。ROS 17/2.8-5 細胞を96穴プレートに10⁴細胞/100 μ l/穴で蒔込み1日間培養し、4mMのヒドロコルチゾンと10%牛胎児血清を含む Ham' SF-12 培地 (G I B C O) に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260 μ lの Ham' SF-12 培地 (G I B C O) にて洗浄し、1mMのイソプロピル-1-メチルキサンチン (IBMX, SIGMA) および10%の牛胎児血清と10mMの HEPES を含む80 μ lの Ham' s F-12 を加え、30分間37℃でインキュベートした。

【0183】中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10 μ g/ml、3.3 μ g/ml、1.1 μ g/ml および0.37 μ g/mlの群、10 μ g/ml、2 μ g/ml、0.5*

配列:

AAATAGCCCT TGACCAGGCA

【0186】配列番号: 2

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

配列:

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG

【0187】配列番号: 3

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列:

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

* μ g/ml および0.01 μ g/mlの群、または10 μ g/ml、5 μ g/ml、1.25 μ g/ml、0.63 μ g/ml および0.31 μ g/mlの群に段階希釈し、4ng/mlに調製したPTHrP (1-34) と等量混合し、各抗体とPTHrP (1-34) の混合液80 μ lを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は、上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP (1-34) の濃度は、1ng/mlになる。10分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄したした後、100 μ lの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit (CAYMANCHEMICAL'S) 付属のEIAバッファー120 μ lを添加しcAMPを抽出後、cAMP EIA kit (CAYMANCHEMICAL'S) 添付の処方に従ってcAMPを測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した (図13~15)。

【0184】

【発明の効果】本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪液質治療剤が提供される。上記物質は、悪液質モデル動物での薬効試験において、体重減少を対照と比較して抑制し、また、生存期間の延長効果も奏することから、悪液質治療剤として有用である。

【0185】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

★鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

20

38

50

28

47

48

【0188】配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列：

GGATCCCGGG TCAGRGAAG GTGGRAACA

29

【0189】配列番号：5

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列：

GTTTCCCAG TCACGAC

17

【0190】配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列：

CAGGAAACAG CTATGAC

17

【0191】配列番号：7

配列の長さ：31

配列の型：核酸

配列：

GTCCTAAGCTT CCACCATGAA ACTTCGGGCT C

31

【0192】配列番号：8

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

TGTTGGATCC CTGCAGAGAC AGTGACCAGA

30

【0193】配列番号：9

配列の長さ：36

配列の型：核酸

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTCCAC CATGGGGTTT GGGCTG

36

【0194】配列番号：10

配列の長さ：41

配列の型：核酸

配列：

TTCCCCGGG CCTTGGTGA GGTGAGGAG ACGGTGAUCA G

41

【0195】配列番号：11

配列の長さ：109

配列の型：核酸

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCCCACGGTC ACCCTGTTCC 60

CGCCCTCCTC TGAGGAGCTC CAAGCCAACA AGGCCACACT AGTGTGTCT 109

【0196】配列番号：12

配列の長さ：110

配列の型：核酸

配列：

GGTTTGGTGG TCTCCACTCC CGCCTTGACG GGGCTGCCAT CTGCCTTCCA GGCCACTGTC 60

ACAGCTCCCG GGTAGAAGTC ACTGATCAGA CACACTAGTC TGGCCTTGTT 110

【0197】配列番号：13

配列の長さ：98

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

49

50

配列:

GGAGTGGAGA CCACCAAACC CTCCAAACAG AGCAACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC 60
 CTGAGCCTGA CGCCCAGCA GTGGAAGTCC CACAGAAG 98

【0198】配列番号: 14

* 鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 106

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

* 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TGTTGAATTC TTACTATGAA CATTCTGTAG GGGCCACTGT CTCTCCACG GTGCTCCCTT 60
 CATGCGTGAC CTGGCAGCTG TAGCTTCTGT GGGACTTCCA CTGCTC 106

【0199】配列番号: 15

※ 鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 43

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

※ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCC 43

【0200】配列番号: 16

★ 鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 20

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

★ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TGTTGAATTC TTACTATGAA 20

【0201】配列番号: 17

☆ 鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 39

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

☆ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTACCTGAG CCTGACGCC 39

【0202】配列番号: 18

◆ 鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 39

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

◆ 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GTAGCTGCTG GCCGCGTACT TGTGTTGCT CTGTTTGA 39

【0203】配列番号: 19

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 46

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GTCTGAATTC AAGCTTAGTC CTAGGTCGAA CTGTGGCTGC ACCATC 46

【0204】配列番号: 20

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 34

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TGTTGAATTC TTACTAACAC TCTCCCCTGT TGAA 34

【0205】配列番号: 21

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 35

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GTCTAAGCTT CCACCATGGC CTGGACTCCT CTCTT 35

【0206】配列番号: 22

鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 48

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

TGTTGAATTC AGATCTAACT ACTTACCTAG GACAGTGACC TTGGTCCC 48

【0207】配列番号: 23

50 配列の長さ: 128

51

52

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

* トポロニー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG AGCTGGGTTT TCCTCGTTGC TCTTTTAAGA 60
GGTGTCCAGT GTCAGGTGCA GCTGGTGGAG TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG 120
TCCTTGAG 128

【0208】配列番号：24

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：125

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACCATTAGTA GTGGTGGTAG TTACACCTAC TATCCAGACA GTGTGAAGGG GCGATTACCC 60
ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG 120
GACAC 125

【0209】配列番号：25

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：132

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTACCACCAC TACTAATGGT TGCCACCCAC TCCAGCCCCT TGCCTGGAGC CTGGCGGACU 60
CAAGACATGC CATAGCTACT GAAGGTGAAT CCAGAGGCTG CACAGGAGAG TCTCAGGGAC 120
CTCCAGGCT GG 132

【0210】配列番号：26

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：110

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG GTTCCCTGGC CCCAGTAAGC AAAGTAAGTC 60
ATAGTAGTCT GTCTGCACA GTAATACACA GCCGTGTCCT CAGCTCTCAG 110

【0211】配列番号：27

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：30

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG 30

【0212】配列番号：28

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：30

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG 30

【0213】配列番号：29

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：133

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATGGCC TGGACTCCTC TCTTCTTCTT CTTTGTCTT CATTGCTCAG 60
GTTCTTTCTC CCAGCTTGTG CTGACTCAAT CGCCCTCTGC CTCTGCCTCC CTGGGAGCCT 120
CGGTCAAGCT CAC 133

【0214】配列番号：30

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：118

トポロニー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AGCAAGATGG AAGCCACAGC ACAGGTGATG GGATTCCTGA TCGTTCTCA GGCTCCAGCT 60
CTGGGGCTGA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGTC TGAGGATGAG GCTGACTA 118

【0215】配列番号：31

50 配列の長さ：128

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

配列：

CTGTGGCTTC CATCTTGCTT AAGTTTCATC AAGTACGAG GGCCCTTCTC TGGCTGCTGC 60
TGATGCCATT CAATGGTGTA CGTACTGTGC TGAATACTCA AGGTGCAGGT GAGCTTGACC 120
GAGGCTCC 128

【0216】配列番号：32

配列の長さ：114

配列の型：核酸

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CCCTCACAAA 60
TTGTTCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GTAATAGTCA GCCTCATCCT CAGA 114

【0217】配列番号：33

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列：

ACAAAGCTTC CACCATG 17

【0218】配列番号：34

配列の長さ：19

配列の型：核酸

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCT 19

【0219】配列番号：35

配列の長さ：75

配列の型：核酸

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60
TTGTTCTTA ATTGT 75

【0220】配列番号：36

配列の長さ：43

配列の型：核酸

配列：

AAAGGATCCT TAAGATCCAT CAAGTACCGA GGGGGCTTCT CTG 43

【0221】配列番号：37

配列の長さ：46

配列の型：核酸

配列：

ACAAAGCTTA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGCC TGAGGA 46

【0222】配列番号：38

配列の長さ：111

配列の型：核酸

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60
TTGTTCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GATATAGTCA GCCTCATCCT C 111

【0223】配列番号：39

配列の長さ：42

配列の型：核酸

配列：

CTTCTCTGGC TGCTGCTGAT ACCATTCAAT GGTGTACGTA CT 42

【0224】配列番号：40

50 配列の長さ：26

* トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 20 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

55

56

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

CGAGGGCCCT TCTCTGGCTG CTGCTG

【0225】配列番号：41

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

GAGAAGGGCC CTARGTACST GATGRAWCTT AAGCA

【0226】配列番号：42

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

CACGAATTCA CTATCGATTG TGGAACCTTC AGAGG

【0227】配列番号：43

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列：

GGCTTGGAGC TCCTCAGA

【0228】配列番号：44

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

GACAGTGGTT CAAAGTTTTT

【0229】配列番号：45

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly

1 5 10 15

Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr

20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys

35 40 45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg

65 70 75

Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr

80 85 90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro

110 115

【0230】配列番号：46

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

配列：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly

1 5 50 10 15

* トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

26

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

35

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

35

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

18

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

57

58

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
20	25	30
Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu		
35	40	45
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr		
50	55	60
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe		
95	100	105
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
110	115	

【0231】配列番号：47

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：116

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr		
20	25	30
Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg		
35	40	45
Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp		
50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg		
65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90
Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val		
95	100	105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
110	115	

【0232】配列番号：48

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr		
20	25	30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys		
35	40	45
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp		
50	55	60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg		
65	70	75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr		
80	85	90

59

60

Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0233】配列番号：49

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
 35 40 45
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0234】配列番号：50

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0235】配列番号：51

★ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

★

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 50 10 15

61

62

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr	
20	25 30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg	
35	40 45
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp	
50	55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg	
65	70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	
80	85 90
Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val	
95	100 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
110	115

【0236】配列番号：52

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly	
1	5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr	
20	25 30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys	
35	40 45
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp	
50	55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg	
65	70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	
80	85 90
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val	
95	100 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
110	115

【0237】配列番号：53

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly	
1	5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr	
20	25 30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg	
35	40 45
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp	
50	55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg	
65	70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	
80	50 85 90

63

64

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

【0238】配列番号：54

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
35 40 45
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
50 55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
65 70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

【0239】配列番号：55

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser
Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30
Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
35 40 45
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
50 55 60
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
65 70 75
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

【0240】配列番号：56

★ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

★

配列：

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly

50 鎖の数：二本鎖

67

トポロジー：直鎖状

配列：

ATG GGG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTC GTT GCT CTT TTA AGA 45
 Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg
 -15 10 5
 GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG 90
 Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
 1 5 10
 GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 15 20 25
 TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA 180
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 30 35 40
 GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT 225
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
 45 50 55
 TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC 270
 Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 60 65 70
 AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG 315
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 75 80 85
 AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAG ACT ACT 360
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr
 90 95 100
 ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC 405
 Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 105 110 115
 TCC TCA 411
 Ser Ser

【0243】配列番号：59

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

【0244】配列番号：60

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

【0245】配列番号：61

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

* * 配列の種類：cDNA to mRNA

68

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

【0246】配列番号：62

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

40 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Tyr Trp Met Gln
 1 5

【0247】配列番号：63

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※50

69

70

配列:

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1

5

10

15

【0248】配列番号: 64

* 配列の長さ: 411

配列の長さ: 11

配列の型: 核酸

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の種類: cDNA to mRNA

配列:

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

【0249】配列番号: 65

*

配列:

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

-15

-10

-5

GGT TCT TTC TCC CAA CTT GTG CTC ACT CAG TCA TCT TCA GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser

1

5

10

TTC TCC CTG GGA GCC TCA GCA AAA CTC ACG TGC ACC TTG AGT AGT 135

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15

20

25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAA CAG CCA CTC 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu

30

35

40

AAG CCT CCT AAG TAT GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45

50

55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCT GGA TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60

65

70

GGT GCT GAT CGC TAC CTT AGC ATT TCC AAC ATC CAG CCA GAA GAT 315

Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp

75

80

85

GAA GCA ATG TAC ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90

95

100

TTT GTG TAT GTT TTC GGC GGT GGG ACC AAG GTC ACT GTC CTA GGT 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

105

110

115

CAG CCC 411

Gln Pro

【0250】配列番号: 66

※ 鎖の数: 二本鎖

配列の長さ: 405

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

※ 配列の種類: cDNA to mRNA

配列:

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

15

10

5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG AGC CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

71	Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	72
	1 5 10	
	GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
	Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
	15 20 25	
	CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
	Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu	
	30 35 40	
	AAG GGC CCT CGG TAC TTG ATG AAA CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
	Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
	45 50 55	
	AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
	Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
	60 65 70	
	GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
	Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
	75 80 85	
	GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
	Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
	90 95 100	
	TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGT	405
	Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
	105 110 115	

【0251】配列番号：67

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA t o mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15 -10 -5	
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1 5 10	
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15 20 25	
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30 35 40	
AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45 50 55	
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60 65 70	
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75 80 85	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	

73

74

90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0252】配列番号：68

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
 Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0253】配列番号：69

配列の長さ：411

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 10 5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG ~~CTG~~ ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

75	Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	76
15		20
30		40
45		55
60		70
75		85
90		100
105		115
120		135
135		150
150		165
165		180
180		195
195		210
210		225
225		240
240		255
255		270
270		285
285		300
300		315
315		330
330		345
345		360
360		375
375		390
390		405
405		420
420		435
435		450
450		465
465		480
480		495
495		510
510		525
525		540
540		555
555		570
570		585
585		600
600		615
615		630
630		645
645		660
660		675
675		690
690		705
705		720
720		735
735		750
750		765
765		780
780		795
795		810
810		825
825		840
840		855
855		870
870		885
885		900
900		915
915		930
930		945
945		960
960		975
975		990
990		1005
1005		1020
1020		1035
1035		1050
1050		1065
1065		1080
1080		1095
1095		1110
1110		1125
1125		1140
1140		1155
1155		1170
1170		1185
1185		1200
1200		1215
1215		1230
1230		1245
1245		1260
1260		1275
1275		1290
1290		1305
1305		1320
1320		1335
1335		1350
1350		1365
1365		1380
1380		1395
1395		1410
1410		1425
1425		1440
1440		1455
1455		1470
1470		1485
1485		1500
1500		1515
1515		1530
1530		1545
1545		1560
1560		1575
1575		1590
1590		1605
1605		1620
1620		1635
1635		1650
1650		1665
1665		1680
1680		1695
1695		1710
1710		1725
1725		1740
1740		1755
1755		1770
1770		1785
1785		1800
1800		1815
1815		1830
1830		1845
1845		1860
1860		1875
1875		1890
1890		1905
1905		1920
1920		1935
1935		1950
1950		1965
1965		1980
1980		1995
1995		2010
2010		2025
2025		2040
2040		2055
2055		2070
2070		2085
2085		2100
2100		2115
2115		2130
2130		2145
2145		2160
2160		2175
2175		2190
2190		2205
2205		2220
2220		2235
2235		2250
2250		2265
2265		2280
2280		2295
2295		2310
2310		2325
2325		2340
2340		2355
2355		2370
2370		2385
2385		2400
2400		2415
2415		2430
2430		2445
2445		2460
2460		2475
2475		2490
2490		2505
2505		2520
2520		2535
2535		2550
2550		2565
2565		2580
2580		2595
2595		2610
2610		2625
2625		2640
2640		2655
2655		2670
2670		2685
2685		2700
2700		2715
2715		2730
2730		2745
2745		2760
2760		2775
2775		2790
2790		2805
2805		2820
2820		2835
2835		2850
2850		2865
2865		2880
2880		2895
2895		2910
2910		2925
2925		2940
2940		2955
2955		2970
2970		2985
2985		3000
3000		3015
3015		3030
3030		3045
3045		3060
3060		3075
3075		3090
3090		3105
3105		3120
3120		3135
3135		3150
3150		3165
3165		3180
3180		3195
3195		3210
3210		3225
3225		3240
3240		3255
3255		3270
3270		3285
3285		3300
3300		3315
3315		3330
3330		3345
3345		3360
3360		3375
3375		3390
3390		3405
3405		3420
3420		3435
3435		3450
3450		3465
3465		3480
3480		3495
3495		3510
3510		3525
3525		3540
3540		3555
3555		3570
3570		3585
3585		3600
3600		3615
3615		3630
3630		3645
3645		3660
3660		3675
3675		3690
3690		3705
3705		3720
3720		3735
3735		3750
3750		3765
3765		3780
3780		3795
3795		3810
3810		3825
3825		3840
3840		3855
3855		3870
3870		3885
3885		3900
3900		3915
3915		3930
3930		3945
3945		3960
3960		3975
3975		3990
3990		4005
4005		4020
4020		4035
4035		4050
4050		4065
4065		4080
4080		4095
4095		4110
4110		4125
4125		4140
4140		4155
4155		4170
4170		4185
4185		4200
4200		4215
4215		4230
4230		4245
4245		4260
4260		4275
4275		4290
4290		4305
4305		4320
4320		4335
4335		4350
4350		4365
4365		4380
4380		4395
4395		4410
4410		4425
4425		4440
4440		4455
4455		4470
4470		4485
4485		4500
4500		4515
4515		4530
4530		4545
4545		4560
4560		4575
4575		4590
4590		4605
4605		4620
4620		4635
4635		4650
4650		4665
4665		4680
4680		4695
4695		4710
4710		4725
4725		4740
4740		4755
4755		4770
4770		4785
4785		4800
4800		4815
4815		4830
4830		4845
4845		4860
4860		4875
4875		4890
4890		4905
4905		4920
4920		4935
4935		4950
4950		4965
4965		4980
4980		4995
4995		5010
5010		5025
5025		5040
5040		5055
5055		5070
5070		5085
5085		5100
5100		5115
5115		5130
5130		5145
5145		5160
5160		5175
5175		5190
5190		5205
5205		5220
5220		5235
5235		5250
5250		5265
5265		5280
5280		5295
5295		5310
5310		5325
5325		5340
5340		5355
5355		5370
5370		5385
5385		5400
5400		5415
5415		5430
5430		5445
5445		5460
5460		5475
5475		5490
5490		5505
5505		5520
5520		5535
5535		5550
5550		5565
5565		5580
5580		5595
5595		5610
5610		5625
5625		5640
5640		5655
5655		5670
5670		5685
5685		5700
5700		5715
5715		5730
5730		5745
5745		5760
5760		5775
5775		5790
5790		5805
5805		5820
5820		5835
5835		5850
5850		5865
5865		5880
5880		5895
5895		5910
5910		5925
5925		5940
5940		5955
5955		5970
5970		5985
5985		6000
6000		6015
6015		6030
6030		6045
6045		6060
6060		6075
6075		6090
6090		6105
6105		6120
6120		6135
6135		6150
6150		6165
6165		6180
6180		6195
6195		6210
6210		6225
6225		6240
6240		6255
6255		6270
6270		6285
6285		6300
6300		6315
6315		6330
6330		6345
6345		6360
6360		6375
6375		6390
6390		6405
6405		6420
6420		6435
6435		6450
6450		6465
6465		6480
6480		6495
6495		6510
6510		6525
6525		6540
6540		6555
6555		6570
6570		6585
6585		6600
6600		6615
6615		6630
6630		6645

77
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0255】配列番号：71

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
 Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0256】配列番号：72

配列の長さ：411

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

40 トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 15 10 5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

79	15	20	25	80
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180			
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu				
30	35	40		
AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225			
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His				
45	50	55		
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270			
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser				
60	65	70		
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315			
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp				
75	80	85		
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360			
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln				
90	95	100		
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405			
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly				
105	110	115		
CAG CCC	411			
Gln Pro				

【0257】配列番号：73

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15	-10
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1	5
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15	20
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30	35
AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45	50
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60	65
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75	80
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90	95
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC	405

81

82

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0258】配列番号：74

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 -10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
 Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0259】配列番号：75

配列の長さ：34

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※40

配列：

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile
 1 5 10 15
 Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu
 20 25 30
 Ile His Thr Ala

【図面の簡単な説明】

【図1】抗PTHrP抗体の患液質に対する治療効果を示す図である。

【図2】抗PTHrP抗体の患液質に対する治療効果を示す図である。

50 【図3】抗PTHrP抗体の患液質に対する治療効果を示す

図である。

【図4】抗PTHrP抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

【図5】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図6】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図7】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図8】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

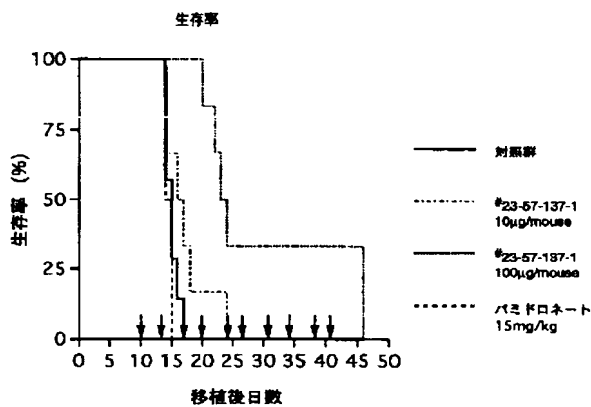
【図9】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図10】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

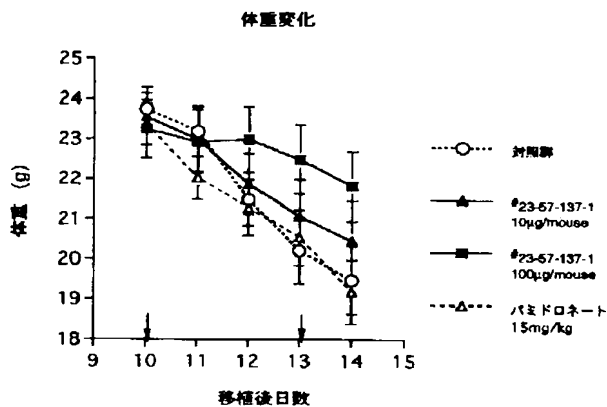
【図11】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図12】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図1】



【図3】



* 【図13】ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

【図14】ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

【図15】ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

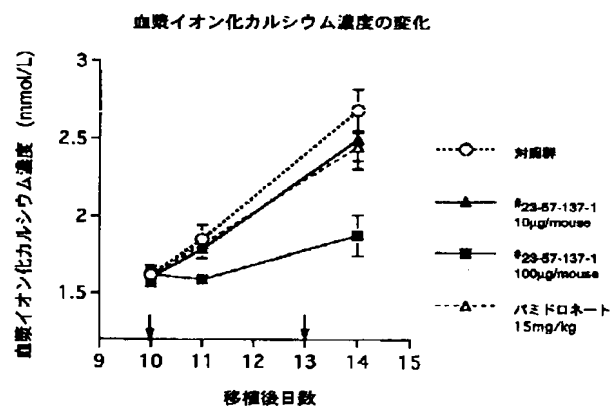
【図16】ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

【図17】ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

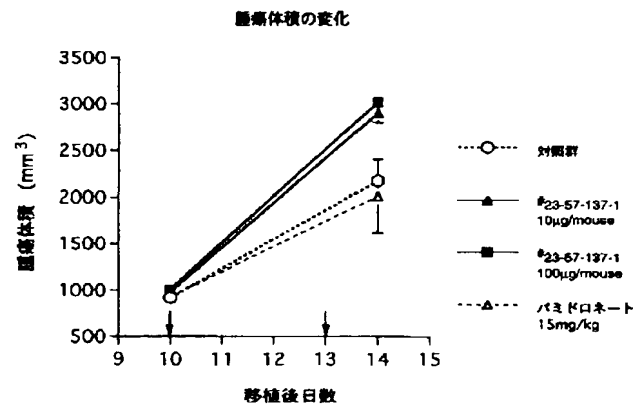
【図18】ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

10 【図19】ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

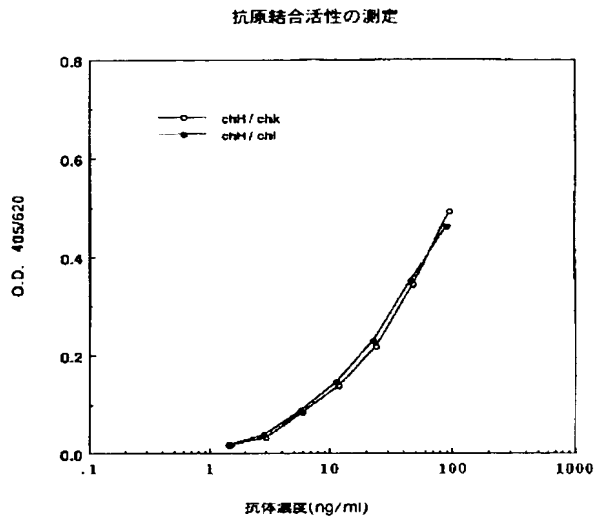
【図2】



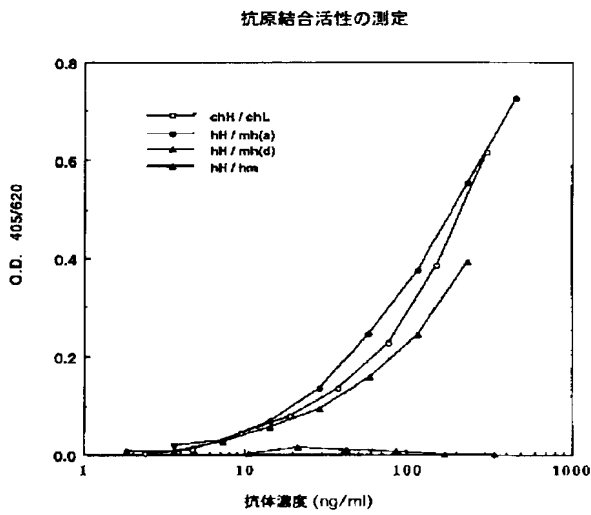
【図4】



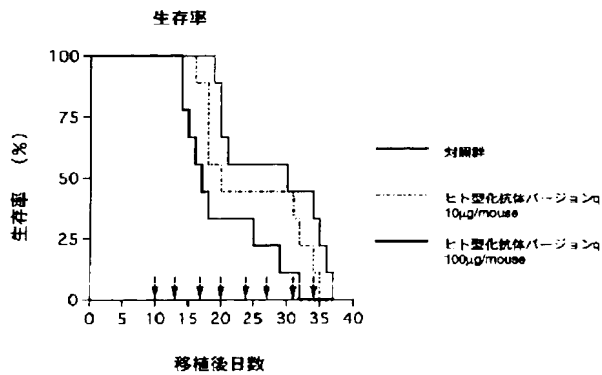
【図5】



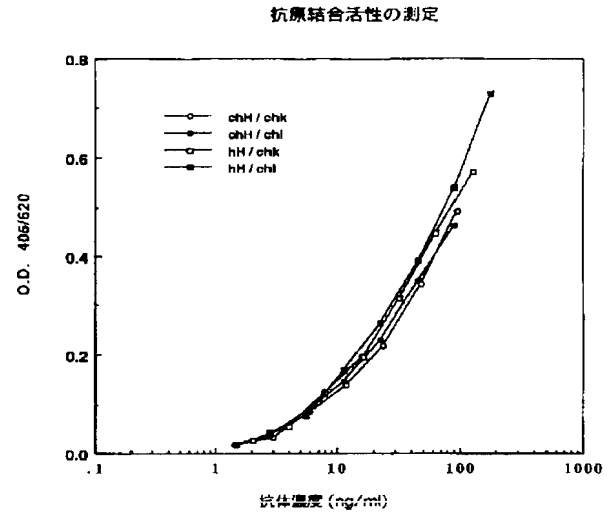
【図7】



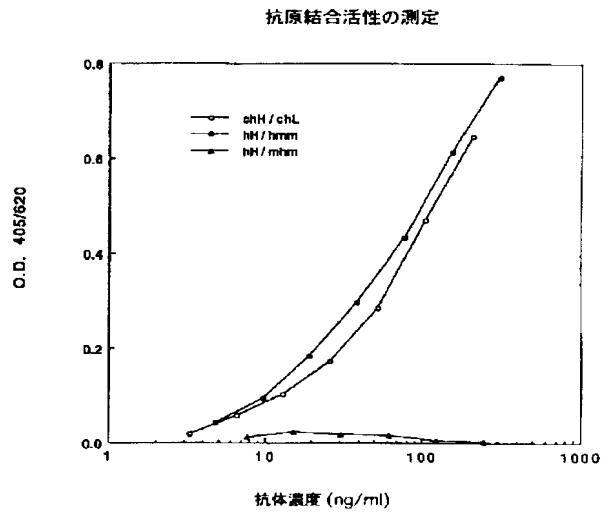
【図16】



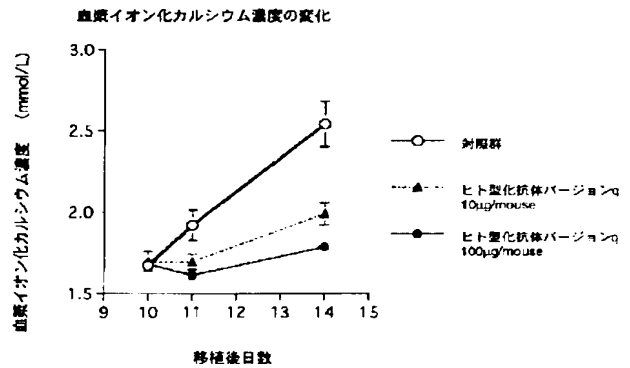
【図6】



【図8】

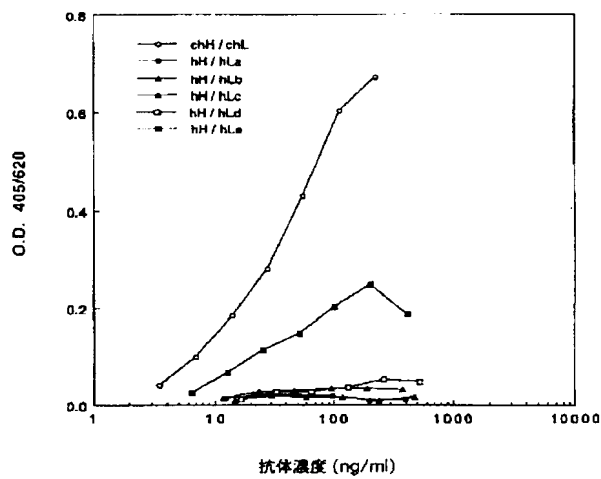


【図17】



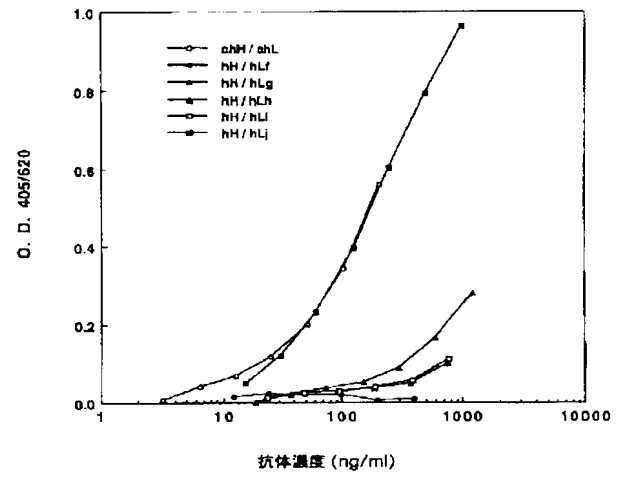
【図9】

抗原結合活性の測定



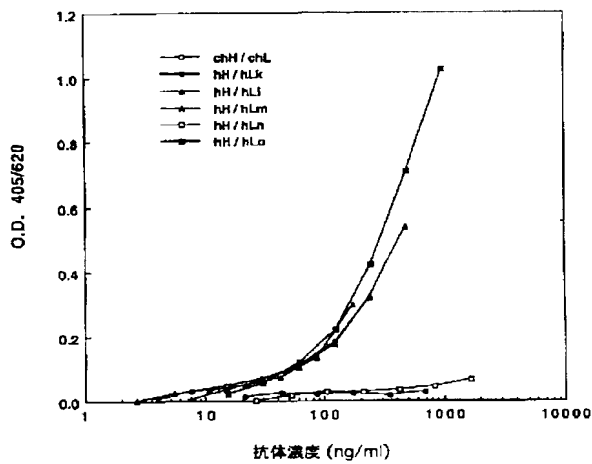
【図10】

抗原結合活性の測定



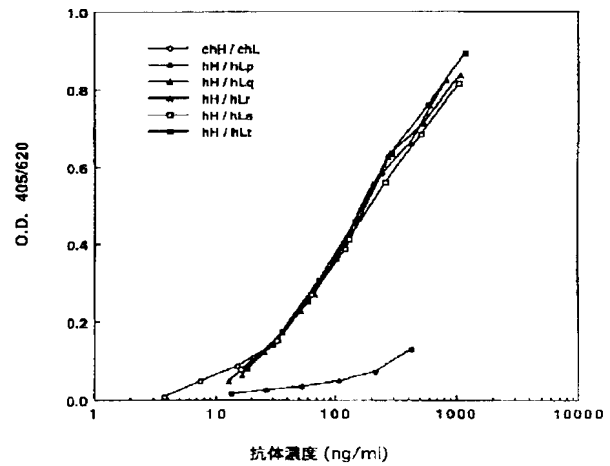
【図11】

抗原結合活性の測定



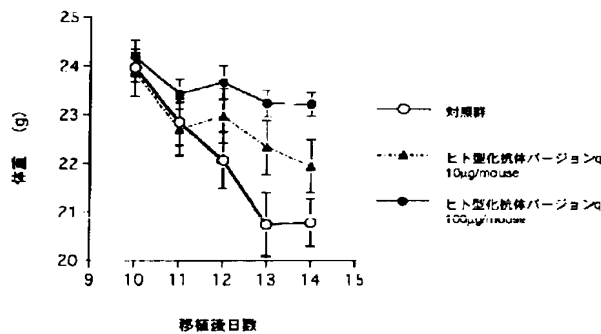
【図12】

抗原結合活性の測定



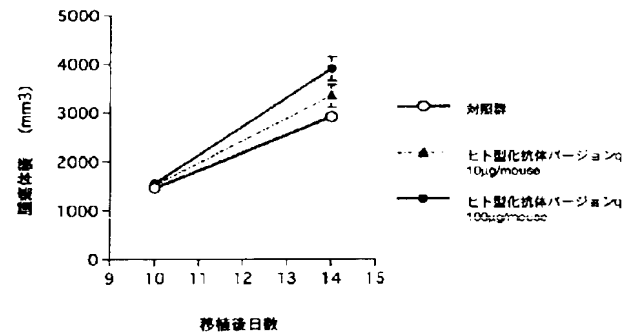
【図18】

体重変化



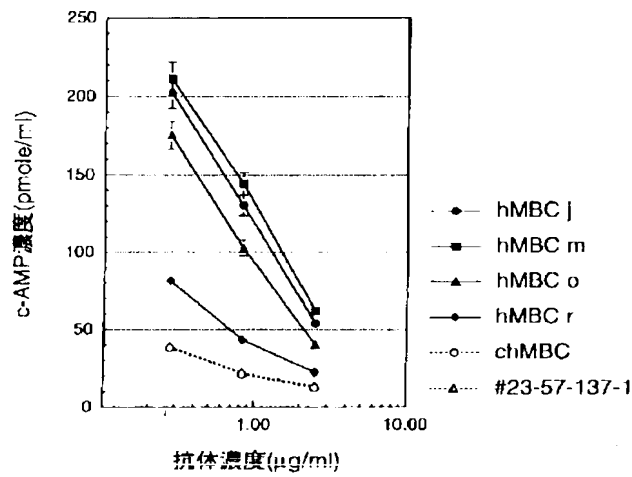
【図19】

腫瘍体積の変化



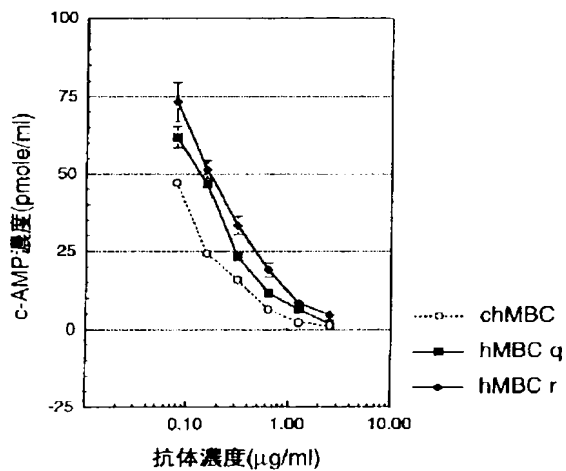
【図13】

ヒト型化抗PTHrP(1-34)抗体の中和活性



【図15】

ヒト型化抗PTHrP(1-34)抗体の中和活性



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F 1

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)